

# 담수산 복족류 (Gastropoda: Architaenioglossa) 3종 간 신속한 Triplex PCR 종 판별 방법

김용휘, 윤봉한, 한호섭, 방인철

순천향대학교 생명과학과

## Development of Rapid Identification Method for Three Species of Freshwater Gastropods (Gastropoda: Architaenioglossa) Using Triplex PCR

Yong Hwi Kim, Bong Han Yun, Ho-Seop Han and In-Chul Bang

Department of Biology, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 31538, Republic of Korea

### ABSTRACT

This study designed species-specific primers for quick and convenient molecular biological species identification of three species belonging to Architaenioglossa widely distributed in Korea and developed a single triplex PCR primer set by verifying specificity and reproducibility. Species-specific primers were designed to amplify species-specific bands (*Pomacea canaliculata*, 223 bp; *Sinotaia quadrata*, 261 bp; *Cipangopaludina chinensis malleata*, 431 bp) in consideration of positions representing genetic variation within species and between species on the cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*co1*) gene base sequence of mitochondrial DNA. In addition, conventional PCR verification experiments were performed according to the amplification cycle and concentration range of genomic DNA (gDNA) to verify the amplification efficiency when configuring the triplex PCR primer set. As a result, considering the PCR reaction cycle and sample amount, the minimum PCR reaction cycle and gDNA concentration were found to be each 25 cycles and 10 ng/μL. Therefore, it is judged that the triplex PCR primer set between the three species belonging to Architaenioglossa developed in this study can contribute to accurate species identification in the industrial field with a quick and simple analysis method at the conventional PCR level.

**Keywords:** *Pomacea canaliculata*, *Sinotaia quadrata*, *Cipangopaludina chinensis malleata*, *co1*, species-specific primer, triplex PCR

### 서 론

복족강 (Gastropoda) 고실목 (Architaenioglossa) 에 속하는 논우렁이과 (Viviparidae) 및 사과우렁이과 (Ampullariidae) 복족류는 우리나라를 비롯한 중국, 일본, 베트남, 대만, 태국, 말레이시아, 필리핀 및 남아메리카 대륙 등지에 널리 분포하며

(Halwart, 1994; Wada, 1999; Hwang *et al.*, 2008; Park, 2015), 강, 호수, 연못 및 논 등 여러 가지 유형의 내수면에 서식한다 (Park *et al.*, 1997; Chiu *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2006).

예로부터 담수산 복족류의 육질부와 패각은 식용, 약용 및 동물 사료로 이용하고 있으며 (Oh *et al.*, 2006), 최근에는 부영양화로 인한 수질 개선 (Hwang *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2015) 과 잡초방제 (Park, 2012; Hwang *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2020) 등 섭식·생태 특성을 활용한 연구들이 진행되고 있어 산업적 가치를 높이고 있다.

통계청이 발표한 ‘어업생산동향조사’에 따르면, 2021년에 집계된 담수산 복족류 (우렁이류) 의 내수면어업 생산량은 약 8,055 t 규모로, 2016년 대비 약 59.1% (4,759 t) 의 증가율을 기록하였으며, 전년도인 2020년 대비 약 32.6%의 증가율을

Received: March 14, 2023; Revised: March 22, 2023;  
Accepted: March 30, 2023

Corresponding author: In-Chul Bang

Tel: +82 (41) 530-1286, e-mail: incbang@sch.ac.kr  
1225-3480/24837

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

**Table 1.** Sample information to three species of freshwater gastropods used in this study

Scientific name	Localities	Country	Collection date	No. of samples
<i>Pomacea canaliculata</i>	Hwaseong-si, Gyeonggi-do	Korea	2021-08-01	30
	Dangjin-si, Chungcheongnam-do	Korea	2021-08-01	30
	Ho Chi Minh City	Vietnam	2022-07-23	30
<i>Sinotaia quadrata</i>	Namwon-si, Jeollanam-do	Korea	2022-01-12	30
<i>Cipangopaludina chinensis malleata</i>	Cheonan-si, Chungcheongnam-do	Korea	2022-04-21	30
	Dangjin-si, Chungcheongnam-do	Korea	2022-04-21	30
	Icheon-si, Gyeonggi-do	Korea	2022-08-18	30

을 기록하여 내수면어업 생산 부문에서 꾸준한 성장세를 나타내고 있다 (e-나라지표, <https://www.index.go.kr>). 또한, 식품의약품안전처에서 집계한 담수산 복족류 (논고둥, 왕우렁이)의 수입 현황에 따르면, 2016년부터 2021년까지 연간 95-190 t 가량 지속적으로 수입되고 있어 (식품의약품안전처, <https://www.mfds.go.kr>), 수입 제품에 대한 국내 수요도 꾸준한 것으로 나타났다.

우리나라의 경우 소비자의 알권리를 보장하고 소비자 및 생산자 간의 공정 거래를 유도하기 위하여 국산 및 원양산 수산물에 대한 ‘수산물 원산지표시 제도’를 시행하고 있으며, 이에 따라, 담수산 복족류는 내수면 패류 (논우렁이류) 로 구분하여 원산지를 표시하도록 규정하였다 (Lee and Hur, 2017). 그러나, 담수산 복족류의 형태적 특성상 패각과 뚜껑이 종 동정에 필요한 분류형질인 경우가 많아, 수입 및 유통 과정에서 육질 부위만 손질되어 거래되는 경우, 육안으로 종 동정이 매우 어렵다.

미토콘드리아 DNA는 다양한 동물 분류군으로부터 쉽게 증폭될 수 있으며 (Hurt and Jiggins, 2005), 핵 DNA와 달리 복제수가 많은 점, 모계 유전을 나타내는 점, 돌연변이율이 높고 보존적인 특성을 타내는 점 (DiMauro, 2007; Area-Gomez and Schon, 2014) 등의 고유한 특성에 따라 분자계통학적 연구 및 종 판별 유전자 마커 개발 연구에 보편적으로 사용되고 있다 (Yang *et al.*, 2021; Ye *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021, 2022). 또한, 미토콘드리아 DNA를 구성하는 단백질 코딩 유전자 (protein coding gene, PCG) 인 cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) 유전자 영역은 동물계를 구성하는 분류군에 대한 기본적인 DNA barcode 염기서열로써 널리 사용되고 있다 (Hebert *et al.*, 2003; Savolainen *et al.*, 2005; Ratnasingham and Hebert, 2007).

본 연구에서는 국내에서 유통되는 왕우렁이 (*Pomacea canaliculata*), 강우렁이 (*Sinotaia quadrata*) 및 논우렁이 (*Cipangopaludina chinensis malleata*) 등 담수산 복족류 3종의 정확하고 간편한 종 판별을 위하여 DNA barcode 유전

자로 널리 사용되고 있는 미토콘드리아 DNA의 cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) 유전자를 활용하여 종 특이적 프라이머 (species-specific primer) 를 설계하고, 하나의 triplex PCR 프라이머 세트로 제작 분자생물학적 종 판별 방법을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 확보

본 연구에서 실험에 사용된 왕우렁이, 강우렁이 및 논우렁이 등 담수산 복족류 3종에 대한 시료 정보는 Table 1에 나타내었다. 종 동정은 Kwon *et al.* (1993), Joshi and Sebastian (2003), Min and Lee (2007) 및 Lee (2009) 에 따라 수행하고 분류체계는 Lee (2016) 을 따랐다.

### 2. 염기서열 결정 및 분석

본 연구에서 사용된 Genomic DNA (gDNA) 는 FastDNA<sup>®</sup> Kit (MP Biomedicals<sup>™</sup>, Irvine, CA, USA) 를 사용하여 추출하고 NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 (NanoDrop Technologies/Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) 를 이용하여 순도와 추출량을 파장대 260/280 nm 에서 확인한 후 분석에 사용하였다.

Polymerase chain reaction (PCR) 은 Folmer *et al.* (1994) 의 실험 방법에 따라 *co1* 유전자 영역의 universal DNA primer 인 LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAAGATATTGG-3' 와 HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' 를 사용하여 PCR 증폭 후, 염기서열을 결정하였다.

결정된 *co1* 유전자의 염기서열들은 FinchTV ver. 1.4.0 (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>) 를 이용하여 수동으로 trimming 하였으며, BioEdit ver. 7.0.9 (Hall, 1999) 에 탑재되어있는 clustalW (Thompson *et al.*, 1994) 를 사용하여 다중염기서열정리 (multiple sequence alignment, MSA) 를 수행한 후, 최종적으로 698 bp의 *co1* 유전자의 염기서열을 확보하였다.

**Table 2.** GenBank<sup>®</sup> accession numbers of the cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*co1*) gene in mitochondrial DNA (mtDNA) for the three species of freshwater gastropods used in this study

Scientific name	Haplotype	GenBank <sup>®</sup> Acc. No.	References
<i>Pomacea canaliculata</i>	Hap. 1	OQ608814	This study
	Hap. 2	OQ608815	This study
	Hap. 3	OQ608816	This study
<i>Sinotaia quadrata</i>	Hap. 1	OQ608817	This study
<i>Cipangopaludina chinensis malleata</i>	Hap. 1	OQ608818	This study

확보된 *co1* 유전자의 DNA polymorphism 분석과 haplotype을 선별하기 위하여 DnaSP, ver. 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017) 를 사용하였으며, 최종적으로 완성된 염기서열들은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 에서 관리하는 Genbank<sup>®</sup>를 통하여 accession number를 부여하였다 (Table 2).

### 3. 종 특이적 프라이머 제작

본 연구에서 담수산 복족류 3종에 대한 종 특이적 프라이머를 제작하기 위하여 *co1* 유전자 염기서열 상에서 종 내 및 종 간 유전적 변이를 반영하는 단일염기다양성 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 위치를 탐색하고, Primer3web ver. 4.1.0 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar *et al.*, 2018) 을 사용하여 왕우렁이 (223 bp), 강우렁이 (361 bp) 및 논우렁이 (431 bp) 등 총 세 쌍의 종 특이적 프라이머를 제작하였다. 이후, 종 특이적 프라이머의 재현성과 안정성 검증을 위하여 Singleplex PCR 실험을 통한 반응 조건 확립과 교차 검증 과정을 거친 다음 최종적으로 하나의 triplex PCR 프라이머 세트를 제작하였다.

### 4. Triplex PCR 증폭 한계 측정

Triplex PCR에 따른 증폭 한계 측정 실험은 Kim *et al.* (2021, 2022) 에 따라, 5개 gDNA 농도 구간 (0.01, 0.1, 1, 10 및 100 ng/ $\mu$ L) 을 설정한 후, AccuPower<sup>®</sup> PCR Premix Kit (BIONEER Corp., Daejeon, Republic of Korea) 에 10 pmole로 희석된 세 쌍의 종 특이적 프라이머를 첨가하고, triplex PCR 반응 조건에 20회, 25회 및 30회 등의 증폭 반복 수를 적용하여 각각 3회씩 반복 실험하였다. 이후, Fragment Analyzer (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster city, CA, USA) 를 이용하여 전기영동하고, PROsize<sup>®</sup> ver. 3.0.1.6 (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany) 를 사용하여 시각화하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 담수산 복족류 3종 간 *co1* 유전자 염기서열 분석

본 연구에서 분석된 담수산 복족류 3종에 대한 미토콘드리아 DNA의 *co1* 유전자 영역 염기서열 분석 결과, 총 698 bp의 염기서열이 확보되었다. 염기 조성 비율은 각각 티민 (thymine, T) 41.1%, 시토신 (cytosine, C) 15.1%, 아데닌 (adenine, A) 24.1% 그리고 구아닌 (guanine, G) 19.7%로 나타났으며, 이에 따라 약 65.2%의 A+T bias를 보여 일반적인 복족류와 이매패류의 연구 결과와 유사한 양상을 보였다 (Holland *et al.*, 2002; Tanaka and Aranishi, 2013; Lee *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2021, 2022). 또한, *co1* 유전자 염기서열 상에서 singleton variable site와 parsimony informative site는 각각 87개와 84개를 나타내었으며, 이에 따른 염기서열 다형성 위치 (polymorphic site) 는 총 171개인 것으로 나타나, 총 염기서열 길이 대비 약 24.5%의 염기서열 다형성을 보였다. 따라서, 이를 반영하는 담수산 복족류 3종의 *co1* 유전자의 haplotype 개수는 각각 왕우렁이 3개, 강우렁이 1개, 및 논우렁이 1개인 것으로 나타났다 (Table 2).

### 2. 담수산 복족류 3종 간 종 특이적 프라이머 설계

담수산 복족류 3종 간 종 특이적 프라이머를 설계하기 위하여 목표 종인 왕우렁이, 강우렁이 및 논우렁이를 비롯한 긴논우렁이 (*Cipangopaludina chinensis*), *Cipangopaludina longispira* 및 *Cipangopaludina wisseli* 등 6종의 *co1* 유전자 염기서열 상에서 나타난 197개의 염기서열 다형성 부위 중에서 종 간 유전적 변이를 나타내는 SNPs 영역을 참고하여 종 간 특이적 프라이머를 설계하였다 (Fig. 1; Table 3).

왕우렁이의 종 특이적 프라이머의 경우, 정방향 프라이머 (PC\_1F) 는 269 bp에서 292 bp (24-mer) 의 SNPs 영역을 포함하도록 설계하였고, 역방향 프라이머(PC\_1R) 는 420 bp에서 441 bp (22-mer) 의 SNPs 영역을 포함하도록 설계하여, 총 223 bp 크기의 종 간 특이적 밴드가 증폭되도록 디자인하였다. 강우렁이의 종 특이적 프라이머의 경우, 정방향 프라이머 (SQ\_1F) 는 181 bp에서 198 bp (18-mer) 의 SNPs 영역을 포함하도록 설계하였고, 역방향 프라이머 (SQ\_1R) 는 471 bp에서 495 bp (25-mer) 의 SNPs 영역을 포함하도록

담수산 복족류 3종 간 Triplex PCR 증 판별 방법

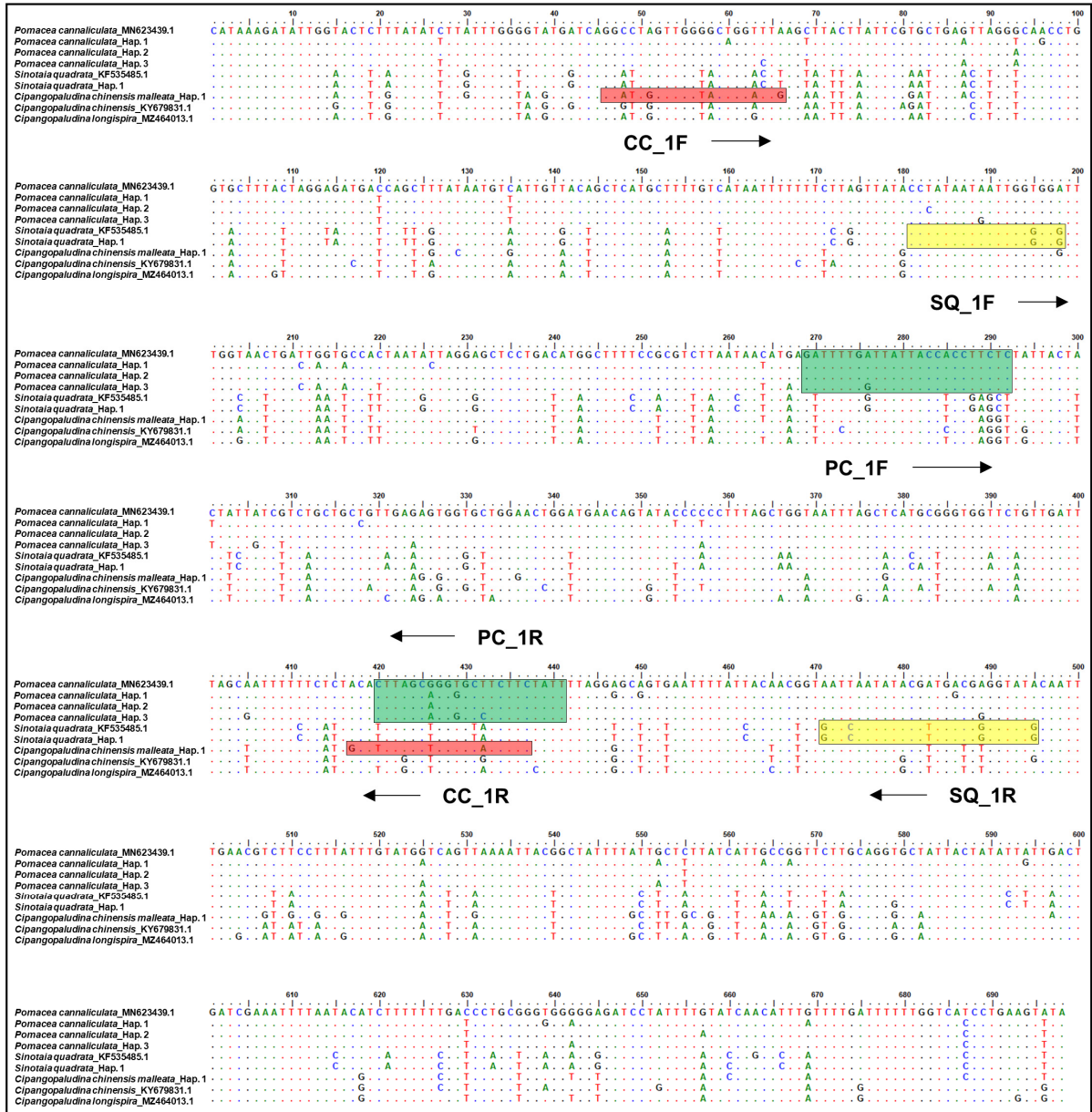


Fig. 1. Species-specific primer positions between the three species of freshwater gastropods on the cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene sequence (698 bp) of mitochondrial DNA (mtDNA).

설계하여, 총 361 bp 크기의 종 간 특이적 밴드가 증폭되도록 디자인하였다. 또한, 논우렁이의 종 특이적 프라이머의 경우, 정방향 프라이머 (CC\_1F) 는 46 bp에서 66 bp (24-mer) 의 SNPs 영역을 포함하도록 설계하였고, 역방향 프라이머 (CC\_1R) 는 412 bp에서 437 bp (26-mer) 의 SNPs 영역을 포함하도록 설계하여, 총 431 bp 크기의 종 간 특이적 밴드가 증폭되도록 디자인하였다.

3. 담수산 복족류 3종 간 Singlex PCR

담수산 복족류 3종 간 종 특이적 프라이머 설계 과정에서 제작된 종 간 특이 프라이머의 특이성, 안정성 및 재현성을 검증하기 위하여 왕우렁이, 강우렁이 및 논우렁이 집단에 관한 Singleplex PCR 실험을 진행하였다.

종 특이적 프라이머의 녹는 온도 (melting temperature, *T*<sub>m</sub>) 를 파악하기 위하여 40℃에서 60℃의 온도 구간에서 Gradient PCR 실험을 수행하였다. 그 결과, 52℃ 온도 구간

**Table 3.** Information on one triplex PCR primer set for the detection of three species of freshwater gastropods developed in this study

Scientific name	Primers	Sequences (5' →3' )	Size	Gene
<i>Pomacea canaliculata</i>	PC_1F	GATTTTGATTATTACCACCTTCTC	223	<i>coI</i> <sup>a</sup>
	PC_1R	AATAGAAGARGCMCCTGCTAAG		
<i>Sinotaia quadrata</i>	SQ_1F	CCTATAATAATTGGGGGGTTTGGC	361	<i>coI</i> <sup>a</sup>
	SQ_1R	CATACCCCGTCAACGTATATTGATC		
<i>Cipangopaludina chinensis malleata</i>	CC_1F	GGATTGGTTGGTACTGGATTG	431	<i>coI</i> <sup>a</sup>
	CC_1R	GAAGATGCACCAGCTAAATGC		

<sup>a</sup>cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene of mitochondrial DNA

**Table 4.** Three singleplex PCR primers and one triplex PCR primer set PCR conditions to detect three species of freshwater gastropods

	Primers	Steps	Temp.	Time	Cycles
Singleplex PCR	PC_1F <sup>a</sup> /PC_1R <sup>a</sup>	Initial denaturation	95°C	5 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	30
		Annealing	53°C	30 sec	
		Extension	72°C	1 min	
		Final extension	72°C	7 min	1
		Storage	4°C	Infinite	-
	SQ_1F <sup>b</sup> /SQ_1R <sup>b</sup>	Initial denaturation	95°C	5 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	30
		Annealing	53°C	30 sec	
		Extension	72°C	1 min	
		Final extension	72°C	7 min	1
		Storage	4°C	Infinite	-
	CC_1F <sup>c</sup> /CC_1R <sup>c</sup>	Initial denaturation	95°C	5 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	30
		Annealing	53°C	30 sec	
Extension		72°C	1 min		
Final extension		72°C	7 min	1	
Storage		4°C	Infinite	-	
Triplex PCR	PC_1F <sup>a</sup> /PC_1R <sup>a</sup> SQ_1F <sup>b</sup> /SQ_1R <sup>b</sup> CC_1F <sup>c</sup> /CC_1R <sup>c</sup>	Initial denaturation	95°C	5 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	30
		Annealing	53°C	30 sec	
		Extension	72°C	1 min	
		Final extension	72°C	7 min	1
		Storage	4°C	Infinite	-

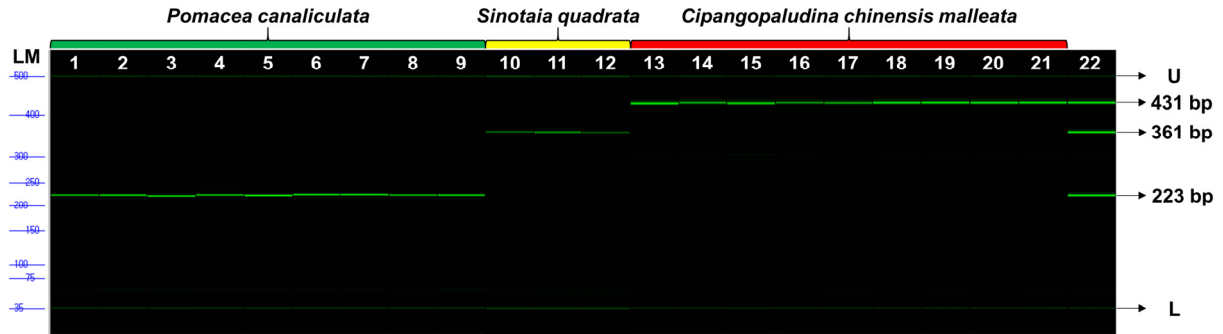
<sup>a</sup>*Pomacea canaliculata*, <sup>b</sup>*Sinotaia quadrata*, <sup>c</sup>*Cipangopaludina chinensis malleata*

에서 명확한 중 간 특이적 밴드가 형성되었으며, 비특이적인 PCR 증폭 현상은 관찰되지 않았다.

본 연구에서 설계된 세 쌍의 중 간 특이적 프라이머에 대한 Singleplex PCR 단계 및 반응 조건은 Table 4에 나타내었다.

#### 4. 담수산 복족류 3종 간 Triplex PCR

이전 단계에서 설정된 Singleplex PCR 단계 및 반응 조건을 기준으로 담수산 복족류 3종에 대하여 triplex PCR 실험을 수행한 후, fragment analyzer로 전기영동 결과를 분석한



**Fig. 2.** Species-specific band positions amplified by triplex PCR from the cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*co1*) gene sequence of mitochondrial DNA of three species of freshwater gastropods (*Pomacea canaliculata*, 223 bp; *Sinotaia quadrata*, 361 bp; *Cipangopaludina chinensis malleata*, 431 bp). Lane 1-3, *P. canaliculata*, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Korea; Lane 4-6, *P. canaliculata*, Dangjin-si, Chungcheongnam-do, Korea; Lane 7-9, *P. canaliculata*, Ho Chi Minh City, Vietnam; Lane 10-12, *S. quadrata*, Namwon-si, Jeollanam-do, Korea; Lane 13-15, *C. chinensis malleata*, Icheon-si, Gyeonggi-do, Korea; Lane 16-18, *C. chinensis malleata*, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, Korea; Lane 19-21, *C. chinensis malleata*, Dangjin-si, Chungcheongnam-do, Korea; Lane 22, mixture of *P. canaliculata* (223 bp), *S. quadrata* (361 bp), and *C. chinensis malleata* (431 bp). LM, ladder marker (35-500 bp); U, upper marker; L, lower marker.

**Table 5.** Triplex PCR amplification experiments were analyzed in 20, 25, and 30 cycles using genomic DNA (gDNA) diluted to 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 ng/ $\mu$ L, respectively

	Cycles	Primers	Density (ng/ $\mu$ L)				
			100	10	1	0.1	0.01
Triplex PCR	20	PCco1_F <sup>a</sup> /PCco1_R <sup>a</sup>					
		SQco1_F <sup>b</sup> /SQco1_R <sup>b</sup>	×	×	×	×	×
		CCco1_F <sup>c</sup> /CCco1_R <sup>c</sup>					
	25	PCco1_F <sup>a</sup> /PCco1_R <sup>a</sup>					
		SQco1_F <sup>b</sup> /SQco1_R <sup>b</sup>	○	○	×	×	×
		CCco1_F <sup>c</sup> /CCco1_R <sup>c</sup>					
30	PCco1_F <sup>a</sup> /PCco1_R <sup>a</sup>						
	SQco1_F <sup>b</sup> /SQco1_R <sup>b</sup>	○	○	○	×	×	
	CCco1_F <sup>c</sup> /CCco1_R <sup>c</sup>						

<sup>a</sup>*Pomacea canaliculata*, <sup>b</sup>*Sinotaia quadrata*, <sup>c</sup>*Cipangopaludina chinensis malleata*

결과 (Figs. 2, 3), 왕우렁이의 경우, 우리나라의 경기도 화성 집단과 충청남도 당진 집단 그리고 베트남의 호치민 집단을 대상으로 채취한 시료의 gDNA에서 종 특이적 밴드가 약 223 bp 부근에서 명확히 증폭되었다. 강우렁이의 경우, 우리나라의 전라남도 남원 집단을 대상으로 채취한 시료의 gDNA에서 종 특이적 밴드가 약 361 bp 부근에서 명확히 증폭되었다. 또한, 논우렁이의 경우, 우리나라의 경기도 이천 집단, 충청남도 천안 및 당진 집단을 대상으로 채취한 시료의 gDNA에서 종 특이적 밴드가 약 431 bp 부근에서 명확히 증폭되었다.

Triplex PCR에 따른 비특이적 PCR 증폭 여부를 확인하기 위하여 왕우렁이, 강우렁이 및 논우렁이의 전기영동도 (electropherogram) 를 확인한 결과, 목표 종을 대상으로 진행한 PCR 산물에서 각 종마다 특이적 peak가 뚜렷하게 나타났으며, 비특이적 peak는 관찰되지 않았다 (Fig. 3).

본 연구에서 설계된 세 쌍의 종 간 특이적 프라이머에 대한 Triplex PCR 단계 및 반응 조건은 Table 4에 나타내었다.

### 5. 담수산 복족류 3종 간 Triplex PCR 증폭 효율성 평가

담수산 복족류 3종 간 Triplex PCR의 증폭 효율성을 측정하기 위하여 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 ng/ $\mu$ L까지 5개의 gDNA 검출 농도 구간을 설정하고, 각 구간마다 20, 25 및 30 회의 PCR 반응 주기를 설정하여 3회 반복 실험한 결과, PCR 반응 주기가 30회일 때, 3개 (1, 10 및 100 ng/ $\mu$ L) 의 gDNA 농도 구간에서 종 특이적 반응이 관찰되어 증폭 효율성이 가장 뛰어난 것으로 판단되었으며, PCR 반응 주기가 25회일 때는 10 및 100 ng/ $\mu$ L 등 2개의 gDNA 농도 구간에서만 종 특이적 반응이 관찰되어 증폭 효율성이 비교적 낮은 것으로 판단되었다 (Table 5). 그러나, PCR 반응 주기가 20회일 때

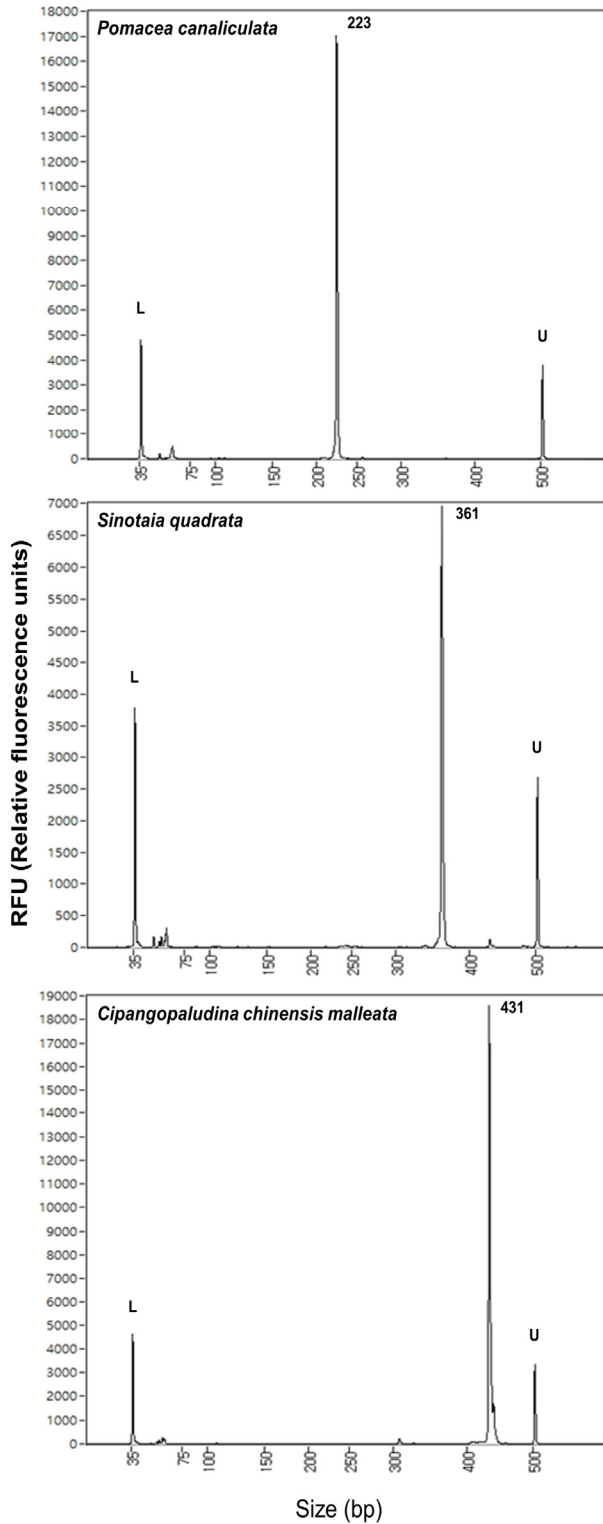


Fig. 3. Electropherogram results of the triplex PCR primer set for species identification between three species of freshwater gastropods, L, lower marker; U, upper marker.

는 종 특이적 반응이 관찰되지 않았다 (Table 5). 이러한 PCR 양상은 담수산 복족류와 동일한 연체동물문인 돌조개상과 (Kim *et al.*, 2021) 및 재첩류 (Kim *et al.*, 2022) 이매패류의 연구 결과와 유사하였다. 따라서, 담수산 복족류 3종 간 Triplex PCR 프라이머 세트는 정확성과 경제성을 고려하여 소요되는 분석 시간과 gDNA 농도를 최소한으로 설정하였을 경우, 25회의 PCR 반응 주기와 10 ng/ $\mu$ L의 gDNA 농도가 검출에 적합한 것으로 판단되었다 (Table 5).

본 연구에서 확보된 담수산 복족류 3종의 미토콘드리아 DNA *coI* 유전자에 대하여 염기서열 상에 나타나는 종 내 및 종 간 변이 영역을 토대로 종 특이적 프라이머를 설계하였다. 이후, Single PCR 반응 조건에 따라 triplex PCR 반응 조건을 확립한 후, triplex PCR 증폭 효율성 평가를 수행하여 최종적으로 triplex PCR 프라이머 세트를 개발하였다. 해당 분자생물학적 종 판별 기술이 우리나라에서 유통되는 담수산 복족류 3종에 대하여 수산물 부정 유통 근절 및 유통 질서 확립에 적극 활용되고 학술 증진에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

### 요 약

국내에서 널리 유통되고 있는 담수산 복족류 3종 (왕우렁이 *Pomacea canaliculata*, 강우렁이 *Sinotaia quadrata* 및 논우렁이 *Cipangopaludina chinensis malleata*) 의 신속하고 편리한 분자생물학적 종 판별을 위하여 미토콘드리아 DNA의 DNA barcode 유전자인 cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*coI*) 유전자 염기서열을 통하여 종 특이적 프라이머를 설계하고 특이성과 재현성을 검증하여 하나의 Triplex PCR 프라이머 세트를 개발하였다. 종 특이적 프라이머는 *coI* 유전자 염기서열 상에서 관찰되는 종 내 및 종 간 유전적 변이를 탐색한 후, 왕우렁이 223 bp, 강우렁이 261 bp 및 논우렁이 431 bp 부근에 종 특이적 반응이 일어나도록 설계하였으며, triplex PCR 프라이머 세트 구성 시, 증폭 효율성을 검증하기 위하여 증폭 주기와 genomic DNA (gDNA) 의 농도 구간에 따른 PCR 검증 실험을 수행하였다. 결과적으로 PCR 반응 주기와 시료량을 고려할 경우, 각각 25회 및 10 ng/ $\mu$ L가 적합한 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서 개발된 담수산 복족류 3종 간 Triplex PCR 프라이머 세트는 일반적인 PCR 수준에서 신속하고 간편한 분석 방법으로 산업 현장에서 정확한 종 판별을 수행하는데 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

### 사 사

이 논문은 2023년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원 (과제명: 수산물 원산지 판별기술 및 현장단

속 키트개발, 20200425), 교육부 재원으로 한국연구재단의 지원 (NRF-2021R1A6A1A03039503) 그리고 순천대학교의 연구비를 지원받아 수행되었습니다.

## REFERENCES

- Area-Gomez, E. and Schon, E.A. (2014) Mitochondrial genetics and disease. *Journal of Child Neurology*, **29**(9): 1208-1215.
- Chiu, Y.W., Chen, C.A. and Chen, H.C. (2002) Genetic variation of the viviparid snail, *Sinotaia quadrata* (Gastropod: Viviparidae), in Taiwan. *Acta Zoologica Taiwanica*, **13**(1): 1-10.
- DiMauro, S. (2007) Mitochondrial DNA medicine. *Bioscience Reports*, **27**(1-3): 5-9.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**: 294-299.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95-98.
- Halwart, M. (1994) The golden apple snail *Pomacea canaliculata* in Asia rice farming systems: present impact and future threat. *International Journal of Pest Management*, **40**(2): 199-206.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. and DeWaard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **270**(1512): 313-321.
- Holland, B.S. and Hadfield, M.G. (2002) Islands within an island: phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*. *Molecular Ecology*, **11**(3): 365-375.
- Hurst, G.D. and Jiggins, F.M. (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**(1572): 1525-1534.
- Hwang, K.C., Ahn, S.H. and Chung, N.J. (2013) Midsummer drainage effects on rice growth and golden apple snails in environment-friendly rice cultivation. *Korean Journal of Organic Agriculture*, **21**(3): 403-411.
- Hwang, S.J., Jeon, M.J., Kim, N.Y. and Kim, B.H. (2008) Grazing rate and pseudofaeces production of native snail *Cipangopaludina chinensis malleata* Reeve on toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Korean Journal of Ecology and Environment*, **41**(spec): 77-85.
- Joshi, R.C. and Sebastian, L.S. (2003) Global advances in ecology and management of golden apple snails. pp. 588, Philippine Rice Research Institute, Munoz.
- Kim, Y.H., Han, H.S., Yun, B.H., Park, J.Y., Baek, I.G. and Bang, I.C. (2021) Development of rapid identification method for four species of ark shells (Bivalvia: Arcoidea) bivalves using multiplex PCR. *Korean Journal of Malacology*, **37**(4): 139-148.
- Kim, Y.H., Yun, B.H., Han, H.S., Kim, H.J. and Bang, I.C. (2022) Development of rapid identification method for Asian clam, *Corbicula fluminea* and brackish water clam, *Corbicula japonica* using duplex PCR. *Korean Journal of Malacology*, **38**(4): 211-220.
- Koressaar, T. and Remm, M. (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, **23**: 1289-1291.
- Koressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R. and Remm, M. (2018) Primer3\_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, **34**: 1937-1938.
- Kwon, O.K., Park, G.M., and Lee, J.S. (1993) Coloured shells of Korea. pp. 445, Academy. Co., Seoul.
- Lee, J.S. (2009) Rediscovery of *Sinotaia quadrata* (Architaenioglossa: Viviparidae) of Kumpung Reservoir in the Jellabuk-do, Korea. *Korean Journal of Malacology*, **25**(3): 243-245.
- Lee, J.S. (2016) List of Korean mollusks. pp. 404, *Korean Journal of Malacology*, Cheonan.
- Lee, M.H., Kim, M.J. and Kim, Y.J. (2015) Control of phytoplankton bloom using apple snail (*Pomacea canaliculata*: Ampullariidae). *Korean Journal of Environmental Biology*, **33**(1): 83-91.
- Lee, S.Y., Lee, H.J. and Kim, Y.K. (2019) Comparative analysis of complete mitochondrial genomes with Cerithioidea and molecular phylogeny of the freshwater snail, *Semisulcospira gottschei* (Caenogastropoda, Cerithioidea). *International journal of biological macromolecules*, **135**: 1193-1201.
- Lee, Y.W. and Hur, Y.S. (2017) A study on application of country of origin labelling system with fishery products. *The institute of Business management*, **40**(2): 125-147.
- Min, D.K. and Lee, J.S. (2007) Shell of the world. pp. 426, Hanguel Graphics, Busan.
- Oh, B.T., Choi, S.G., Cho, S.H. and Cho, S.H. (2006) Proximate composition, amino acid, fatty acid and inorganic matter of apple snail. *Korean Journal of Food Preservation*, **13**(6): 749-753.
- Park, G.M. (2015) Karyological studies of *Sinotaia quadrata* (Benson, 1842)(Gastropoda: Viviparidae) of Korea. *Cytologia*, **80**(1): 89-93.
- Park, G.M., Jeong, K.H. and Jung, Y.H. (1997) A comparative study of two species of Viviparidae (Mollusca: Prosobranchia): *Cipangopaludina chinensis malleata* and *C. japonica* in Korea. *Korean Journal of Malacology*, **13**(1): 9-19.
- Park, K.H. (2012) A potential biological weed control by golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in wet hill seeded rice with iron-coated seeds. *Korean Journal of Weed Science*, **32**(3): 273-279.
- Ratnasingham, S. and Hebert, P.D. (2007) BOLD: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife>).

- org). *Molecular Ecology Notes*, **7**(3): 355-364.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., GN Sánchez-Gracia, A. (2017) DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **34**: 3299-3302.
- Savolainen, V., Cowan, R.S., Vogler, A.P., Roderick, G.K. and Lane, R. (2005) Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**(1462): 1805-1811.
- Shin, J.H., Chae, M.H., Kim, S.K., Kwon, J.B. and Kim, J.S. (2020) Weed control by young golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in environmentfriendly no-tillage machine transplanting rice paddy fields. *Weed & Turfgrass Science*, **9**(3): 235-243.
- Tanaka, T. and Aranishi, F. (2013) Mitochondrial DNA markers for PCR-based phylogenetic analysis of ark shells. *Open Journal of Marine Science*, **3**(4): 182.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. and Rozen, S.G. (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, **40**(15): e115.
- Wada, T. (1999) Introduction of the apple snail *Pomacea canaliculata* and its impact on rice agriculture, p. 143-151. **In**: Proceedings of the International Workshop on Biological Invasions of Ecosystems by Pests and Beneficial Organisms (Yanom, E., K. Matsuo, M. Shiyomi and D.A. Andow, eds.). National Institute Agro-Environmental Sciences, Tsukuba.
- Wood, T.S., Anurakpongsatorn, P., Chaichana, R., Mahujcharyawong, J. and Satapanajaru, T. (2006) Heavy predation on freshwater bryozoans by the golden apple snail, *Pomacea canaliculata* Lamarck, 1822 (Ampullariidae). *Tropical Natural History*, **6**(1): 31-36.
- Yang, Y., Abalde, S., Afonso, C.L., Tenorio, M.J., Puillandre, N., Templado, J. and Zardoya, R. (2021) Mitogenomic phylogeny of mud snails of the mostly Atlantic/Mediterranean genus *Tritia* (Gastropoda: Nassariidae). *Zoologica Scripta*, **50**(5): 571-591.
- Ye, B., Hirano, T., Saito, T., Dong, Z., Do, V.T. and Chiba, S. (2021) Molecular and morphological evidence for a unified, inclusive *Sinotaia quadrata* (Caenogastropoda: Viviparidae: Bellamyinae). *Journal of Molluscan Studies*, **87**(3): eyab013.
- Yoo, Y.H., Kim, B.H. and Hwang, S.J. (2008) Grazing characteristics of native snail *Cipangopaludina chinensis malleata* on the hibernal diatom bloom in eutrophic lake and stream. *Korean Journal of Ecology and Environment*, **41**(3): 338-347.

